

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 482号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏 名	平 松 良 浩		
論文題目	Degradation of Tob1 mediated by SCF ^{Skp2} -dependent ubiquitination (SCF ^{Skp2} によるユビキチン化を介した Tob1 の分解)		

博士(医学) 平 松 良 浩

論文題目

Degradation of Tob1 mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitination

(SCF^{Skp2}によるユビキチン化を介したTob1の分解)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Tob1は過剰発現によりG0-G1停止を誘導する増殖抑制タンパクであり、サイクリンD1のプロモーター活性を負に制御している。Tob1欠損マウスで肺や肝、リンパ節などに腫瘍が発生することや、さらにヒトの癌腫における発現減少が報告されており、腫瘍抑制因子であることが示唆されている。最近、Tob1がユビキチン(Ub)ープロテアソーム経路による分解調整をうけていることが明らかとなったがTob1のユビキチンリガーゼは不明である。Ubープロテアソームシステムは癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物、転写因子、細胞周期制御因子といった短い半減期を有するさまざまなタンパクの量的調整を担っている。Ub活性化酵素(E1)、Ub結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)によってポリユビキチン化された基質は、26Sプロテアソームによって選択的に認識され分解される。標的タンパクの選択的特異性はE3によって規定されている。

細胞周期のG1-S移行には主にSCF(Skp1/Cullin/F-box protein)複合体というE3が関与している。p21、p27、p57、p130やFOXO1といった細胞周期抑制因子や癌抑制遺伝子産物はSkp2というSCF複合体を構成するF-boxタンパクによって認識されユビキチン依存的分解を受ける。また、Tob1もG1-S移行の負の制御因子であり、ユビキチン依存的分解を受けることから、本研究においてSkp2とTob1の関係について検討した。その結果、Skp2はTob1と結合しTob1のUb依存的分解を促進するTob1のE3であることが明らかになった。

〔材料ならびに方法〕

HeLa細胞、HEK293細胞、MEF細胞(Skp2^{+/+}, ^{-/-})を用いて、生化学的手法によりSkp2とTob1のタンパク結合、Skp2によるTob1のユビキチン化、Skp2の量的変化に伴うTob1の安定性の変化を検討した。内因性Skp2がTob1の分解に寄与しているかはRNAi法を用いて検証した。

〔結果〕

HeLa細胞を用いた同調実験でTob1の発現はG1期で減少しており、Skp2やサイクリンD1の発現と逆相関していた。そこで内因性のTob1とSkp2の結合を検討したところ両者の結合が観察された。HEK293細胞にSkp2とTob1の野生型および変異体を発現させて結合実験を行ったところ、Skp2のロイシンリッチリピート(LRR)がTob1結合ドメインであることが判明した。同様にTob1の166-273番目のアミノ酸がSkp2との結合部位であることがわかった。このSkp2とTob1の結合にリン酸化は関与していなかった。*in vivo*及び*in vitro*のユビキチン化実験では、野生型のSkp2だけがTob1のユビキチン化を促進することが示された。さらに、Skp2ノックアウトマウスの繊維芽細胞やSkp2をsiRNAによってノックダウンしたHeLa細胞(Skp2 KD HeLa)において、内因性のTob1が安定化し、半減期の延長とTob1タンパクの蓄積が見られた。Skp2 KD HeLaではTob1の蓄積と同時に標的遺伝子であるサイクリンD1の発現の減少が確認された。

〔考察〕

本論文の実験結果はSkp2がTob1のユビキチン依存的分解に関与するE3であることを強く示唆している。しかしながらG1期でのTob1の発現減少に比較してSkp2の発現亢進開始がやや遅く、Tob1を標的とする他のE3の存在も否定できない。

Tob1はErk1/Erk2によるリン酸化によりサイクリンD1に対する転写抑制活性を失うことが知られているが、Skp2のノックダウンによるTob1が蓄積するのと同時にTob1の標的遺伝子であるサイクリンD1の発現の減少が起こることから、Skp2が量的制御を介してTob1の機能を調節していることが強く示唆された。

Tob1はG1-S移行を負に制御するとともに、癌抑制遺伝子産物でもある。Skp2は癌腫での発現亢進や予後との相関がある癌遺伝子産物として知られており、Skp2とTob1の関係は細胞周期制御や腫瘍の悪性形質獲得における分子生物学的イベントを理解する上で重要であると考えられる。

〔結論〕

Tob1はSkp2の新たなユビキチン化の標的タンパクであることが証明された。

論文審査の結果の要旨

申請者は細胞周期に関わる分子の一つをユビキチン化という視点でその生物学的あるいはヒト腫瘍における意義を明らかにしたものである。扱った分子Tob1は、過剰発現によりG0-G1停止を誘導する増殖抑制タンパクであり、サイクリンD1のプロモーター活性を負に制御している。Tob1欠損マウスで肺や肝、リンパ節などに腫瘍が発生することや、さらにヒトの癌腫における発現減少が報告されており、腫瘍抑制因子であることが示唆されている。最近、Tob1がユビキチン(Ub)－プロテアソーム経路による分解調整を受けていることが明らかとなったがTob1のユビキチンリガーゼは不明である。細胞周期のG1-S移行には主にSCF(Skp1/Cullin/F-box protein)複合体というユビキチンリガーゼE3が関与している。p21、p27、p57、p130やFOXO1といった細胞周期抑制因子や癌抑制遺伝子産物はSkp2というSCF複合体を構成するF-boxタンパクによって認識されユビキチン依存的分解を受ける。一方、Tob1もG1-S進行の負の制御因子であり、ユビキチン依存的分解を受けることから、本研究ではSkp2とTob1の関係について以下の実験を行い検討し、Skp2はTob1と結合しTob1のUb依存的分解を促進するTob1のE3であることが明らかになった。

〔材料ならびに方法〕

HeLa細胞、HEK293細胞、MEF細胞(Skp2^{+/+}, -/-)を用いて、生化学的手法によりSkp2とTob1のタンパク結合、Skp2によるTob1のユビキチン化、Skp2の量的変化に伴うTob1の安定性の変化を検討した。内因性Skp2がTob1の分解に寄与しているかはRNAi法を用いて検証した。

〔結果〕

HeLa細胞を用いた同調実験でTob1の発現はG1期で減少しており、Skp2やサイクリンD1の発現と逆相関していた。そこで内因性のTob1とSkp2の結合を検討したところ両者の結合が観察された。HEK293細胞にSkp2とTob1の野生型および変異体を発現させて結合実験を行ったところ、Skp2のロイシンリッチリピート(LRR)がTob1結合ドメインであることが判明した。同様にTob1の166-273番目のアミノ酸がSkp2との結合部位であることがわかった。このSkp2とTob1の結合にリン酸化は関与していなかった。*in vivo*及び*in*

*vitro*のユビキチン化実験では、野生型のSkp2だけがTob1のユビキチン化を促進することが示された。さらに、Skp2ノックアウトマウスの繊維芽細胞やSkp2をsiRNAによってノックダウンしたHeLa細胞(Skp2 KD HeLa)において、内因性のTob1が安定化し、半減期の延長とTob1タンパクの蓄積が見られた。Skp2 KD HeLaではTob1の蓄積と同時に標的遺伝子であるサイクリンD1の発現の減少が確認された。

〔考察〕

申請者はこれらの結果から、以下のように考察した。実験結果はSkp2がTob1のユビキチン依存的分解に関与するE3であることを強く示唆している。しかしながらG1期でのTob1の発現減少に比較してSkp2の発現亢進開始がやや遅く、Tob1を標的とする他のE3の存在も否定できない。Tob1はErk1/Erk2によるリン酸化によりサイクリンD1に対する転写抑制活性を失うことが知られているが、Skp2のノックダウンによるTob1が蓄積するのと同時にTob1の標的遺伝子であるサイクリンD1の発現の減少が起こることから、Skp2が量的制御を介してTob1の機能を調節しているようである。Tob1はG1-S移行を負に制御するとともに、癌抑制遺伝子産物でもある。一方Skp2は癌腫での発現亢進や予後との相関がある癌遺伝子産物としても知られており、Skp2とTob1の関係は細胞周期制御や腫瘍の悪性形質獲得における分子生物学的イベントを理解するうえでも整合性のあるものである。

〔結論〕

結論としては、本論文はTob1がSkp2の新たなユビキチン化の標的タンパクであることを明確に証明し、解析を加えたものである。

上記の申請論文内容について審査委員会では以下の質問をおこなった。

- 1) 実験で見ている現象は核内のことにもかかわるのか
- 2) 実験でつかった細胞の細胞周期はどのくらいの時間か
- 3) E3はヒトゲノム中にどのくらいあるか
- 4) F-boxというのはどういうものか
- 5) Skp1とSkp2は交互作用しているか
- 6) Skp2の転写機構はどうなっているのか
- 7) Tob1とerbB2との関係はどうか
- 8) 何故Skp2のWestern blotのバンドが二本みえるのか
- 9) 内在性のTob1, Skp2はHEK293細胞には検出されないのか
- 10) ロイシンリッチリピートとロイシンジッパーとの関係は
- 11) 遺伝子導入の効率はどうであったか
- 12) Tob1は多量体をつくるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶 村 春 彦	
	副査	小 出 幸 夫	副査 上 里 忠 良